



632

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re United States Patent Application of:

Applicant: Kleinschmidt, et al.

Application No.: 09/230,929

Date Filed: April 2, 1999

Title: VECTOR FOR ACTIVATING
THE IMMUNE SYSTEM
AGAINST
PAPILLOMAVIRUSES AND
CELLS INFECTED WITH
PAPILLOMAVIRUSES OR
FRAGMENTS THEREOF

) Docket No.: 4121-107 RCE 2

) Examiner J. T. Voitach

) Group Art Unit: 1632

) Confirmation No.: 3634

) Customer No.: 23448



23448

PATENT TRADEMARK OFFICE

FIRST CLASS MAIL CERTIFICATE

I hereby certify that I am mailing the attached documents to the Commissioner for Patents on the date specified, in an envelope addressed to the Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, and First Class Mailed under the provisions of 37 CFR 1.8.

Candace White

Candace White

May 2, 2003

Date of Mailing

RECEIVED

MAY 08 2003

TECH CENTER 1600/2900

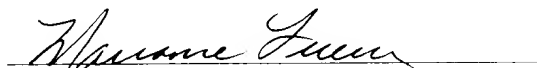
SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY GERMAN PATENT APPLICATION
NUMBER 196 31 357.0, TO PERFECT PRIORITY CLAIM IN U.S. PATENT APPLICATION
NUMBER 09/230,929

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Enclosed is a certified copy of priority German patent application number 196 31 357.0, to perfect the priority claim in the above-identified U.S. patent application.

Respectfully submitted,

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Marianne Fuierer", is written over a horizontal line.

Marianne Fuierer

Reg. No. 39,983

Attorney for Applicants

INTELLECTUAL PROPERTY/
TECHNOLOGY LAW
P.O. Box 14329
Fax: (919) 419-9354
Attorney File No.: 4121-107 RCE 2



RECEIVED
MAY 08 2003
TECH CENTER 1600/2900

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 196 31 357.0

Anmeldetag: 02. August 1996

Anmelder/Inhaber: Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, Heidelberg/DE

Bezeichnung: Vektor zur Aktivierung des Immunsystems gegen
mit Papillomviren bzw. Sequenzen davon assoziierten
Zellen

IPC: C 12 N, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 11. April 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Anmelder: Deutsches Krebsforschungszentrum
Vektor zur Aktivierung des Immunsystems gegen mit Papillomviren bzw. Sequenzen davon assoziierten Zellen
Unser Zeichen: K 2336 - hu / wd

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft einen Vektor, der sich zur Aktivierung des Immunsystems gegen mit Papillomviren bzw. Sequenzen davon assoziierten Zellen eignet, ein einen solchen Vektor enthaltendes Vakzinierungs-Mittel und die Verwendung beider.

Papillomviren infizieren das Epithelgewebe von Mensch und Tier. Human-Papillomviren (HPVs) finden sich in benignen, z.B. Warzen, Kondylome im Genitalbereich, und malignen, z. B. Karzinome der Haut und der Gebärmutter, epithelialen Neoplasmen. Auch werden HPVs für die Entwicklung maligner Tumoren des Respirationstrakts in Betracht gezogen. Ferner werden HPVs für die Entwicklung squamöser Karzinome der Lunge als zumindest mitverantwortlich angesehen.

Papillomviren weisen ein ikosaedrisches Capsid ohne Hülle auf, in dem ein zirkuläres, doppelsträngiges DNA-Molekül von etwa 7900 bp vorliegt. Das Capsid umfaßt ein Hauptcapsid-Protein (L1) und ein Nebencapsid-Protein (L2). Ersteres wird durch den offenen Leserahmen L1 (L1-ORF) und letzteres durch L2-ORF kodiert. L1 oder L1 und L2 führen in vitro zur Ausbildung von Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs). Die Transformationsfähigkeit von Papillomviren wird den Proteinen E6 und E7 zugeschrieben. Diese werden durch E6-ORF bzw. E7-ORF kodiert.

Viele Versuche wurden unternommen, das Immunsystem gegenüber Zellen zu stimulieren, die mit Papillomviren bzw. Sequenzen davon assoziiert sind. Bisher haben diese Versuche jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse gebracht.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzu-

stellen, mit dem das Immunsystem aktiviert werden kann, Zellen, insbesondere Tumorzellen, zu erkennen und auszuschalten, die mit Papillomviren bzw. Sequenzen davon assoziiert sind.

5 Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Vektor mit einer für ein Fusionspolypeptid kodierenden Nukleinsäure, wobei das Fusionspolypeptid ein
10 strukturelles Papillomvirus-(Poly)peptid und ein nicht-transformierendes, durch ein frühes Papillomvirus-Gen kodiertes (Poly)peptid umfaßt.

Der Ausdruck "Vektor" umfaßt jeglichen Vektor, der sich für einen Gentransfer, d.h. das Einführen von Nukleinsäuren in Zellen, eignet. Der Vektor kann in den
15 Zellen episomal verbleiben oder in das Genom integriert werden. Ferner kann der Vektor ein Plasmid- oder ein Virus-Vektor sein. Beispiele eines Virus-Vektors sind retrovirale, Adenovirus-, Vacciniavirus- oder Adeno-assoziierte Virus (AAV)-Vektoren, wobei letztere bevorzugt sind. Ein AAV-Vektor kann in Wildtyp- oder veränderter Form vorliegen. Auch kann er nur solche Sequenzen, wie ITR-Se-
20 quenzen, umfassen, die für seine Transduktionsfähigkeit notwendig sind. Günstig kann es aber auch sein, wenn er zusätzlich solche Sequenzen, wie rep-Sequenzen, umfaßt, die ihm die Integration in das Chromosom 19 ermöglichen. Ein Virus-Vektor kann als Virus-Partikel oder in Form seiner Nukleinsäure vor-
liegen. Bevorzugt ist es, wenn der Virus-Vektor replikationsdefekt ist.

25 Der Ausdruck "Papillomvirus" umfaßt jegliche Papillomviren oder Sequenzen davon, die mit Zellen, insbesondere Tumorzellen assoziiert sein können. Insbesondere können es HPVs und ganz besonders "high risk" HPVs, wie HPV16, 18, 33, 35 und 45, sein.

30 Der Ausdruck "Nukleinsäure" umfaßt jegliche Nukleinsäure, wie DNA und/oder RNA, die für ein Fusionspolypeptid kodiert, das ein strukturelles Papillomvirus-

(Poly)peptid und ein nicht-transformierendes, durch ein frühes Papillomvirus-Gen kodiertes (Poly)peptid umfaßt. Günstig ist es, wenn die Nukleinsäure exprimierbar ist. Besonders günstig ist es, wenn sie unter der Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors, wie eines Gewebe- oder Tumor-spezifischen Promotors steht.

Der Ausdruck "strukturelles Papillomvirus-(Poly)peptid" umfaßt jegliches Peptid bzw. Polypeptid eines Papillomvirus, das für die Struktur des Papillomvirus zumindest mitverantwortlich ist. Insbesondere wird ein solches (Poly)Peptid durch L1-ORF oder L2-ORF eines Papillomvirus bzw. durch einen Teil dieser kodiert. Besonders bevorzugt ist ein (Poly)peptid, das als VLP vorliegen kann.

Der Ausdruck "ein nicht-transformierendes, durch ein frühes Papillomvirus-Gen kodiertes (Poly)peptid" umfaßt jegliches Peptid bzw. Polypeptid, das durch ein frühes Papillomvirus-Gen, insbesondere durch E1-, E2-, E4-, E5-, E6 oder E7-ORF, bzw. durch einen Teil dieses kodiert und nicht-transformierend ist. Der Ausdruck "nicht-transformierend" weist darauf hin, daß das (Poly)peptid von Natur aus oder durch ein Eingreifen keine Transformationsfähigkeit besitzt. Ein bevorzugtes (Poly)peptid wird durch E6- oder E7-ORF eines Papillomvirus bzw. durch einen Teil dieser kodiert.

Der Ausdruck "Fusionspolypeptid" weist darauf hin, daß das strukturelle Papillomvirus-(Poly)peptid und das nicht-transformierende, durch ein frühes Papillomvirus-Gen kodierte (Poly)peptid in jeglicher Kombination in dem Fusionspolypeptid vorliegen können. Auch können die einzelnen (Poly)peptide von verschiedenen Papillomviren stammen. Vorzugsweise ist der C-Terminus des strukturellen (Poly)peptids mit dem N-Terminus des nicht-transformierenden (Poly)peptids verbunden. Ferner kann es von Vorteil sein, wenn das nicht-transformierende (Poly)peptid innerhalb des strukturellen (Poly)peptids lokalisiert ist. Ein bevorzugtes Fusionspolypeptid umfaßt ein durch HPV 16 L1-ORF kodiertes (Poly)peptid und ein durch HPV16 E6- bzw. E7-ORF kodiertes (Poly)peptid. Ferner wird ein Fusionspolypeptid bevorzugt, das ein durch HPV 18 L1-ORF kodiertes

(Poly)peptid und ein durch HPV 18 E6- bzw. E7-ORF kodierte (Poly)Peptid umfaßt.

5 Zur Herstellung eines vorstehenden Vektors können übliche Verfahren durchgeführt werden. Beispielsweise kann ein AAV-Vektor als Virus-Partikel wie folgt hergestellt werden: An das 3'-Ende des HPV 16 L1-ORF wird das 5'-Ende des HPV 16 E6-ORF ligiert. Zuvor wurde ein Teil des E6-ORF deletiert, wodurch die transformierenden Eigenschaften von E6 zerstört wurden. Das DNA-Fragment L1-ORF-E6-ORF wird in einen AAV-Vektor inseriert, der die 5'- und 3'-ITR-Sequenzen von AAV, nicht aber die für die AAV-Rep und -Cap-Proteine kodierenden Sequenzen enthält. Die Insertion erfolgt zwischen den beiden ITR-Sequenzen. Das DNA-Fragment L1-ORF-E6-ORF steht unter der Kontrolle eines bezüglich AAV heterologen Promotors. Der erhaltene AAV-Vektor wird in Zellen transfiziert, welche die AAV-Rep und -Cap-Proteine exprimieren. Ferner werden 15 die Zellen mit einem Helfer-Virus, z.B. Adenovirus, infiziert, wodurch der AAV-Vektor als Virus-Partikel erhalten wird.

Mit einem vorstehenden Vektor kann das Immunsystem aktiviert werden, Zellen, insbesondere Tumorzellen, zu erkennen und auszuschalten, die mit Papillomviren bzw. Sequenzen davon assoziiert sind. Dies kann prophylaktisch und in einer Therapie erreicht werden. Hierzu werden Zellen des betreffenden Organismus, wie Antigen-präsentierende Zellen, z.B. dendritische Zellen, B-Zellen, Makrophagen und/oder mit Papillomviren bzw. Sequenzen davon assoziierte Tumorzellen bzw. Prä-Tumorzellen mit dem Vektor transduziert. Die Transduktion kann durch 25 übliche Verfahren erfolgen. Liegt der Vektor als Virus-Partikel vor, ist es günstig, die Zellen mit diesen zu infizieren. Liegt er andererseits als Nukleinsäure, z.B. DNA, vor, ist es angeraten, die Zellen mit dieser zu transfizieren. Als Transfektionstechniken sind z.B. Elektroporation, Lipofektion und Partikel-Kanone zu nennen. Die Zellen können in dem Organismus vorliegen. Andererseits können 30 die zu transduzierenden Zellen auch aus dem Organismus isoliert, außerhalb des Organismus transduziert und dann wieder in den Organismus zurückgeführt werden. Solche Zellen werden als autologe Zellen bezeichnet. Des weiteren

können hinsichtlich des Organismus auch allogene Zellen zur Transduktion verwendet werden. Hierbei ist es günstig, wenn diese Zellen einem dem Organismus entsprechenden HLA-Typ angehören. Der Fachmann kennt Verfahren, Zellen einen bestimmten HLA-Typ zu verleihen. Weiterhin ist es günstig, wenn bei einem vorstehenden Verfahren die Tumorzellen oder Prä-Tumorzellen vor ihrer Rückführung in den Organismus inaktiviert werden. Hierfür können übliche Verfahren, wie Bestrahlung, durchgeführt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vakzinierungs-Mittel, das einen vorstehenden Vektor und übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Verdünnungsmittel, Trägermittel, etc. umfaßt. Günstig kann es sein, wenn das Vakzinierungs-Mittel weitere Substanzen enthält, die das Immunsystem, z.B. gegen Tumorzellen, aktivieren können. Solche Substanzen können insbesondere MHC-1-Moleküle, kostimulatorische Moleküle, z.B. B7, und sekretorische Immunstimulatoren, z.B. Zytokine, wie IL-2, IL-12, Interferon und GM-CSF, sein. Die Substanzen können z.B. in Form von Peptiden, insbesondere synthetischen Peptiden, vorliegen. Auch können die Substanzen in Form von sie kodierenden Expressionsplasmiden vorliegen, die ferner für HLA-Moleküle kodieren können. Besonders günstig ist es, wenn das Vakzinierungs-Mittel auch die durch den Vektor transduzierten Zellen enthält. Für die Zellen gelten vorstehende Ausführungen. Handelt es sich um Tumor- oder Prä-Tumorzellen, ist es günstig, wenn die Zellen inaktiviert sind.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, das Immunsystem gegen Zellen zu aktivieren, die mit Papillomviren bzw. Sequenzen davon assoziiert sind. Diese Zellen können Tumorzellen bzw. Prä-Tumorzellen sein. Die Aktivierung des Immunsystems kann prophylaktisch und in der Therapie erfolgen. Die vorliegende Erfindung stellt einen neuen Schritt dar, über eine in vivo bzw. ex vivo Gentherapie schwerste Erkrankungen zu therapieren.

Die Erfindung wird durch das nachfolgende Beispiel erläutert.

Beispiel: Herstellung eines Vektors, der für ein HPV16 L1-E7 Fusionspolypeptid kodiert

5 Von einem genomischen HPV16 Klon (vgl. Kirnbauer et al, (1993), 6929-6936) wurde der L1-ORF durch eine PCR-Reaktion amplifiziert. Hierzu wurden L1-spezifische Primer verwendet, die am 5'-Ende eine zusätzliche Bgl II-Restriktionsstelle aufweisen. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde mit Bgl II gespalten und in die BamHI-Restriktionsstelle des üblichen Vektors pUC19 inseriert. Durch spezifische Mutagenese wurde an der Position 7051 des L1-ORF eine EcoRV-Restriktionsstelle, gefolgt von einem Translationsstopcodon (TAA) eingeführt. 10 Damit wurde erreicht, daß der L1-ORF für ein L1 kodierte, dem die letzten 34 Aminosäuren fehlten.

15 In einer weiteren PCR-Reaktion wurde jener Teil des E7-ORF von HPV16 amplifiziert, der für die ersten 50 Aminosäuren von E7 kodiert. Die verwendeten Primer enthielten an ihrem 5'-Ende eine EcoRV-Restriktionsstelle. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in die EcoRV-Restriktionsstelle vorstehenden pUC19 Vektors inseriert, der für das verkürzte L1 kodierte. Somit wurde ein L1-E7 Fusionsgen erhalten. Dieses wurde über XbaI/SmaI in den üblichen Baculovirus-Vektor pVL1392 inseriert. Von diesem wurde das L1-E7 Fusionsgen durch 20 NotI/SmaI herausgeschnitten und in die NotI-Restriktionsstelle des AAV-Vektors pUF2 (vgl. Zolotukhin et al., J. Virol. 70, (1996), 4646-4654) inseriert. Es wurde ein Vektor erhalten, der für ein HPV16 L1-E7 Fusionspolypeptid kodiert. Virale Partikel des Vektors wurden gemäß üblicher Verfahren erhalten (vgl. 25 Rolling and Samulski, Molecular Biotechnology 3, (1995), 9-15).

Anmelder: Deutsches Krebsforschungszentrum
"Verfahren zur Aktivierung des Immunsystems
gegen mit Papillomviren bzw. Sequenzen davon
assoziierten Zellen"

Unser Zeichen: K 2336 - hu / wd

Patentansprüche

1. Vektor mit einer für ein Fusionspolypeptid kodierenden Nukleinsäure, wobei das Fusionspolypeptid ein strukturelles Papillomvirus-(Poly)peptid und ein nicht-transformierendes, durch ein frühes Papillomvirus-Gen kodiertes (Poly)peptid umfaßt.
2. Vektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Papillomvirus ein HPV ist.
3. Vektor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das HPV ausgewählt ist aus HPV 16, 18, 33, 35 und 45.
4. Vektor nach einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein Virus- oder ein Plasmid-Vektor ist.
5. Vektor nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Virus-Vektor ein AAV-, retroviraler, Adenovirus- oder Vacciniavirus-Vektor ist.
6. Vektor nach einem der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure unter der Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors steht.
7. Vektor nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Promotor ein Gewebe- oder Tumor-spezifischer Promotor ist.

8. Vektor nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß das strukturelle Papillomvirus-(Poly)peptid durch L1-ORF bzw. durch einen Teil davon kodiert ist.

5 9. Vektor nach einem der Ansprüche 1 - 8, dadurch gekennzeichnet, daß das nicht-transformierende, durch ein frühes Papillomvirus-Gen kodierte (Poly)peptid durch E6-ORF oder E7-ORF bzw. durch einen Teil dieser kodiert ist.

10 10. Vakzinierungs-Mittel, enthaltend den Vektor nach einem der Ansprüche 1 - 9 und übliche Hilfsstoffe.

11. Vakzinierungs-Mittel nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß weitere das Immunsystem aktivierende Substanzen vorliegen.

15 12. Vakzinierungs-Mittel nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor in Zellen vorliegt.

20 13. Vakzinierungs-Mittel nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Papillomviren bzw. Sequenzen davon assoziierte Tumorzellen und/oder Prä-Tumorzellen sind.

25 14. Vakzinierungs-Mittel nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen und die Prä-Tumorzellen inaktiviert sind.

30 15. Verwendung des Vektors nach einem der Ansprüche 1 - 9 und des Vakzinierungsmittels nach einem der Ansprüche 10 - 14 zur Aktivierung des Immunsystems gegen mit Papillomviren bzw. Sequenzen davon assoziierten Zellen.

K 2336

Zusammenfassung

5 **Verfahren zur Aktivierung des Immunsystems gegen mit
Papillomviren bzw. Sequenzen davon assoziierten Zellen**

10 Die vorliegende Erfindung betrifft einen Vektor mit einer für ein Fusionspolypep-
tid kodierenden Nukleinsäure, wobei das Fusionspolypeptid ein strukturelles
Papillomvirus-(Poly)peptid und ein nicht-transformierendes, durch ein frühes
Papillomvirus-Gen kodiertes (Poly)peptid umfaßt.

 Ferner betrifft die Erfindung ein einen solchen Vektor enthaltendes Vakzinie-
rungs-Mittel und die Verwendung beider.